

УДК 577.3

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ГЛИЦЕРИНА И ТРЕГАЛОЗЫ*

© 2017 В.В. Горохов, П.П. Нокс, Б.Н. Корватовский,
Н.Х. Сейфуллина, С.Н. Горячев, В.З. Пашенко**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия;
электронная почта: vz.paschenko@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.06.17
После доработки 15.08.17

В данной работе исследовали температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции молекул триптофана в глицериновом растворе и в 1 М водном растворе трегалозы. Кинетики затухания флуоресценции измеряли в спектральной области 292,5–417,5 нм с наносекундным временным разрешением. Аппроксимацию кинетик затухания флуоресценции проводили в трехэкспоненциальном приближении, определяли спектральное распределение (DAS) этих компонент. Был обнаружен антибатный ход температурных зависимостей времен затухания флуоресценции двух компонент (быстрой и средней) в температурном диапазоне от –60 до +10 °С. Третья (медленная) компонента показывала слабую зависимость от температуры. Антибатное поведение времен затухания флуоресценции двух компонент моделировали в предположении, что в определенном температурном интервале происходит переход части молекул триптофана, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой В-формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую R-форму с промежуточным временем жизни флуоресценции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: триптофаны, ротамеры, флуоресценция, температурная зависимость, кинетики затухания флуоресценции.

Функциональная активность белков существенно зависит от их конформационной динамики — способности к конформационным перестройкам, необходимым для реализации их специфических функций [1]. Считается, что решающее значение для функционально значимых конформационных изменений имеют быстрые стохастические структурные флуктуации в пико- или наносекундном временном интервале [2] между различными конформационными подсостояниями белковых молекул [3]. Полагают, что белки характеризуются большим набором этих конформационных подсостояний, разделенных локальными энергетическими барьерами и отражающих сложные рельефы их энергетических поверхностей. Поскольку высоты данных энергетических барьеров могут значительно варьировать, временная шкала белковой

подвижности может охватывать несколько порядков величины [4, 5]. При понижении температуры стохастическая белковая подвижность замедляется и может локализоваться на временной шкале, характерной для специфического функционального процесса, осуществляемого конкретным белком. На динамические характеристики белка существенное воздействие оказывает также тип и количество окружающих его молекул растворителя (прежде всего — воды). Эти молекулы создают локальный поверхностный слой, который может действовать как пластификатор или, наоборот, как стабилизатор конформационных мод, соответственно, облегчая или затрудняя переходы между конформационными подсостояниями [3, 6]. Следовательно, динамика белка, влияющая на его функциональную активность, может быть модифицирована не только с помощью температурного фактора, но и путем внедрения белка в матрицу полимерного геля, дегидратации, а также сольватации различными криорастворителями [6–9]. Malferrari et al. [10] исследовали влияние гидратации и дегидратации трегалозной матрицы на кинетику восстановления первичного донора ФС1 Р700⁺. Редегидратация трегалозной мат-

Принятые сокращения: DAS — спектральное распределение компонент кинетики затухания флуоресценции (Decay Associated Spectra).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM17-276, 00.00.2017.

** Адресат для корреспонденции.

рицы при комнатной температуре имитировала эффект замораживания ФСИ в водно-глицериновом растворе. Параллельное изучение динамических и функциональных показателей ферментов в условиях варьирования температуры и состава растворителей является мощным инструментом изучения механизмов процессов, осуществляемых этими белками.

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформации белков, их динамики, межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамическое (спектрально-кинетическое) поведение молекул триптофана очень чувствительно к состоянию окружающей среды [11, 12]. Флуоресценция индольного хромофора высокочувствительна к состоянию его окружения, в результате он является индикатором даже небольших изменений в этом окружении [13]. Если структура белков известна, то изменения триптофановой флуоресценции могут быть, в принципе, интерпретированы в терминах структурных изменений на уровне атомного разрешения. В качестве показателя состояния внутримолекулярной динамики белка, в т.ч. при понижении/повышении температуры, уже давно измеряют положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора [14, 15]. Сложнее обстоит ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте зависимости от температуры длительности флуоресценции, требует тщательных комплексных исследований. Возможным подходом на этом пути является изучение температурных зависимостей времен жизни флуоресценции триптофана в различных средах, что и явилось предметом данного исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения кинетики флуоресценции проводили на установке с коррелированным по времени и длине волны счетом единичных фотонов PML-16 («Becker&Hickl», Германия). Данная установка оборудована 16-канальной мультянодной трубкой Hamamatsu R5900, содержащей 16 раздельных выходных анодных элементов и общую катодную и диодную систему. Сигнал флуоресценции проходит через полихроматор, снабжен-

ный дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей спектральную полосу измерительной системы 200 нм с разрешением 12,5 нм/канал. Это позволяет регистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), спектра (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 («Edinburg Photonics», Шотландия), длительность импульса составляла 870 пс, спектральная ширина — 10 нм, частота следования импульсов — 10 МГц, время накопления сигнала — 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (τ , λ , I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции для любого спектрального канала в области 292,5–417,5 нм. Образец при измерениях находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термодпары. Время охлаждения до -180°C составляло ~ 10 мин, скорость последующего нагревания — 5–7 град/мин. В работе использовали триптофан и трегалозу фирмы «Sigma» (США) и глицерин фирмы «Merck» (Германия). Концентрация триптофана в образце составляла 10 мМ.

Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных на разных спектральных каналах в области длин волн 292,5–417,5 нм с интервалом 12,5 нм. Число экспериментальных точек для каждой кинетики составляет 4096. Для каждого спектрального канала измеряли также число фотонов, зарегистрированных в данной области спектра.

Аппроксимацию экспериментальной кинетики проводили для каждого спектрального канала при помощи программы SPCImage («Bekker&Hickl», Германия) по формуле (1):

$$F(\tau, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \times \exp(-\tau/\tau_i), \quad (1)$$

где $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны предэкспоненциальный множитель компоненты со временем жизни τ_i , i обозначает номер компоненты.

Данная программа позволяет разлагать кинетики по методу Марквардта–Левенберга на сумму от одной до пяти экспонент, свернутых с аппаратной функцией IRF, измеряемой для каждого спектрального канала. Мы ограничились тремя экспонентами, т.к. дальнейшее увеличение числа компонент не приводило к снижению χ^2 . На первом этапе производили свободное варьирование параметров a_i и τ_i для каж-

дого спектрального канала. Затем полученные значения τ_i ($1 \leq i \leq 3$) усредняли по всем спектральным каналам. Полученные усредненные значения τ_i подставляли в программу глобального анализа по всем спектральным каналам Globals Unlimited (Illinois University) как неварьируемые параметры для окончательного определения предэкспоненциальных коэффициентов $a_i(\lambda)$, которые затем использовали для получения DAS (Decay Associated Spectra) для каждой компоненты. Среднеквадратичную (стандартную) ошибку аппроксимации χ_r^2 рассчитывали по формуле (2):

$$\chi_r^2 = 1/(N - p - 1) \times \sum_j (d_j - f_j)^2 / d_j \quad (1 \leq j \leq 4096), \quad (2)$$

где d_j — экспериментальные значения кинетики затухания флуоресценции в момент времени j , f_j — значение рассчитанной для данного момента времени теоретической кривой, равной свертке функции (1) с аппаратной функцией ($f = F \otimes \text{IRF}$), N — число экспериментальных точек, p — число параметров теоретической кривой.

Полученные значения χ_r^2 усредняли по всем спектральным каналам. В наших вычислениях среднее значение χ_r^2 не превышало 1,4 в случае трехэкспоненциального приближения, тогда как в биэкспоненциальном приближении значение величин χ_r^2 было выше 1,8. Поэтому во всех расчетах мы пользовались трехэкспоненциальным приближением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы детально исследовали температурные зависимости длительности флуоресценции триптофана в 50%-ном водно-глицериновом растворе и в 1 М водном растворе трегалозы. При комнатной температуре кинетика флуоресценции в обоих случаях хорошо аппроксимируется тремя экспонентами со временами $\tau_1 \approx 4 \pm 0,05$ нс, $\tau_2 \approx 6,5 \pm 0,08$ нс и $\tau_3 \approx 12,5 \pm 0,2$ нс. Согласно нашим исследованиям [16], сложный характер кинетики затухания флуоресценции триптофанов в растворе и в составе белков можно объяснить наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг связи $C_\alpha-C_\beta$, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле триптофана. При этом обычно заселенность одного из ротамеров существенно выше, чем двух других. В свою очередь среди этих двух также преобладает по заселенности один из ротамеров.

В случае, когда триптофаны находятся в составе белковой матрицы, в дополнение к явным ротамерам боковой цепи триптофана специфическим источником гетерогенности кинетики регистрируемого сигнала флуоресценции являются микроконформационные состояния белков в локальном окружении индольного кольца.

Поэтому для белков правильнее говорить о конформерах вместо ротамеров [17]. Для описания кинетики затухания флуоресценции триптофанов в белке больше подходит непрерывное распределение времен жизни, чем описание с использованием дискретного набора экспонент. Физической основой для таких распределений являются взаимные переходы между различными конформациями, каждая из которых характеризуется квази-континуумом энергетических подсостояний для триптофанового остатка в различных окружениях [17].

Вместе с тем и описание дискретными экспонентами, очевидно, может дать адекватную качественную картину характера происходящих в исследуемых образцах изменений состояния флуоресцирующих хромофоров при широком варьировании температуры среды. Мы смоделировали эту ситуацию для регистрируемой температурной зависимости кинетики флуоресценции растворов триптофана в глицерине и трегалозе.

На рис. 1 приведены кинетики затухания флуоресценции триптофана и их аппроксимации в трехэкспоненциальном приближении при температурах -100 и -30 °C. Видно, что трехэкспоненциальное приближение хорошо описывает кинетики затухания флуоресценции. Точность определения при данном трехэкспоненциальном приближении (95%-ный доверительный интервал) короткого времени затухания

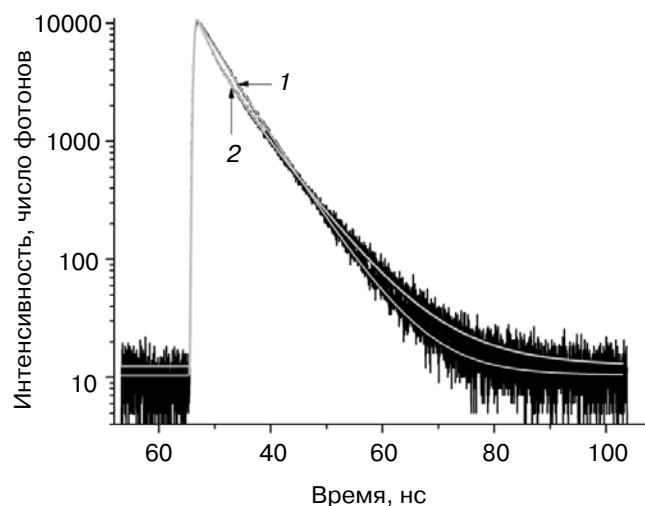


Рис. 1. Кинетики затухания флуоресценции триптофана в глицерине при температуре -100 °C (1) и -30 °C (2) при длине волны 330 нм

флуоресценции составляет примерно ± 50 пс, промежуточного времени ± 80 пс, для длинной компоненты ± 200 пс.

Пример полученного набора спектров DAS для трехэкспоненциального разложения кинетик флуоресценции для триптофана в растворе при температуре -100 и -30 °C показаны на рис. 2.

Результаты анализа спектрально-временных параметров кинетик флуоресценции (рис. 1) показали, что в исследуемых образцах при низких температурах триптофан присутствует главным образом в двух ротамерных формах, отвечающих коротковолновой («голубой», В) и длинноволновой («красной», R) областям спектра флуоресценции. При температуре жидкого азота В-форма характеризуется временем жизни $\tau_1 \approx 4,8$ нс и максимумом флуоресценции около 295 нм; R-форма при этой температуре имеет время жизни флуоресценции $\tau_2 \approx 6,5$ нс и максимум около 315 нм. Вклад третьей формы с $\tau_3 = 12,5$ нс мал, и в последующем кинетическом анализе мы его не учитывали.

На рис. 3 представлены температурные зависимости длительности флуоресценции В- и R-форм ротамеров триптофана в водно-глицериновом растворе (а) и в трегалозе (б). Видно, что в диапазоне температур от -180 до -60 °C τ_B и τ_R изменяются слабо. При дальнейшем увеличении температуры τ_B начинает уменьшаться с 4,8 до 2,2 нс, достигая минимума при -13 °C, при дальнейшем росте температуры значение τ_B вновь увеличивается. В свою очередь в диапазоне температур от -60 до -15 °C τ_R увеличивается, а затем уменьшается. При этом относительные вклады в общий сигнал флуоресценции от

В- и R-форм при $T = -100$ °C составляют 0,47 и 0,53, тогда как при $T = -30$ °C эти вклады равны 0,1 и 0,9 соответственно. Величину вкладов от различных форм ротамеров в общий сигнал флуоресценции Φ определяли по формулам (3):

$$\Phi_B = S_B \tau_B / (S_B \tau_B + S_R \tau_R); \quad \Phi_R = S_R \tau_R / (S_B \tau_B + S_R \tau_R), \quad (3)$$

где $S_{B(R)}$ обозначает площади спектральных амплитуд кинетических компонент со временами τ_B и τ_R (a_1 и a_2 на рис. 2, при этом вклад от третьей компоненты не учитывался). Налицо имеется перекачка энергии излучения от В- к R-форме.

Из наших данных следует, что длительности кинетических компонент (рис. 3) и их спектральные амплитуды (данные не приведены) зависят от температуры. Характерным для триптофанов как в водно-глицериновом растворе, так и в трегалозе является существование температурной области, в которой времена жизни флуоресценции В- и R-компонент изменяются антибатно. Время третьей компоненты во всей области температур было практически постоянным (данные не приведены), при этом ее спектральная амплитуда незначительна (рис. 2). Область перехода части В-ротамеров в R-форму, как видно из рис. 3, попадает в область температур выше -50 °C. Это область, в которой происходит размораживание используемых нами замороженных растворов. Так, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии для ~30%-ного раствора трегалозы (по весу) в воде точка стеклования (T_g) составляет около -42 °C [18]. Согласно данным Olsson et al. [18], раствор трегалозы этой концентрации частично крис-

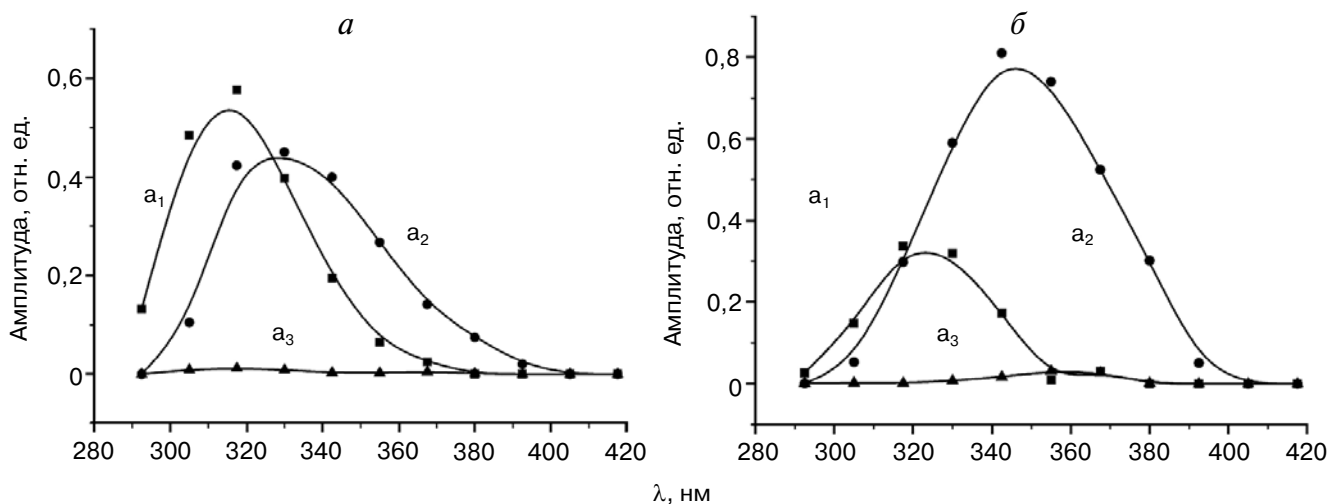


Рис. 2. DAS (Decay Associated Spectra) для трехэкспоненциального разложения кинетик флуоресценции триптофана при температуре -100 °C (а) и -30 °C (б). Квадратами, кружками и треугольниками обозначены, соответственно, спектры быстрой, промежуточной и медленной компонент флуоресценции

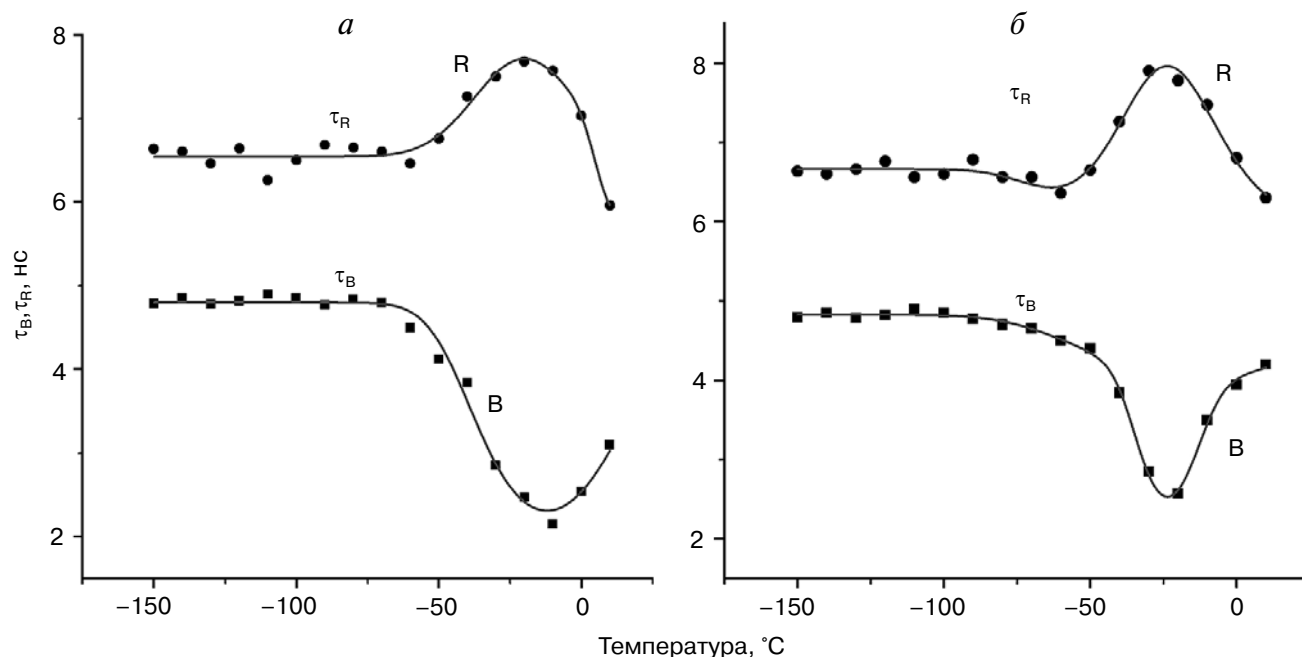


Рис. 3. *a* — Температурная зависимость длительности флуоресценции В- и R-форм триптофана в водно-глицериновом растворе, *б* — в трегалозе. Аппроксимацию температурной зависимости проводили по формулам (4)

таллизуется в ходе нагревания между температурами стеклования (T_g) и плавления (около -10°C). Иными словами, в ходе нагревания застеклованного раствора в этой области происходят существенные изменения внутримолекулярной динамики системы, которые и приводят к наблюдаемому переходу между ротамерами триптофана. Сходные процессы, очевидно, протекают и в ходе нагревания замороженного 50%-ного раствора глицерина.

Итак, при определенной температуре в среде возникают условия для перехода части В-ротамеров в R-форму. Как будет показано ниже, это происходит в результате попадания точки пересечения электронных поверхностей возбужденных состояний двух форм ротамеров в область перекрывания спектров локальных колебаний этих ротамеров в данной области энергии. Как следствие, происходит увеличение скорости затухания флуоресценции В-ротамеров (уменьшение времени жизни) и замедление скорости затухания флуоресценции R-ротамеров (увеличение времени жизни). Условия для данного перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$ должны иметь резонансный характер типа гауссовой зависимости, аналогичный перекрытию спектров локальных колебаний.

Зависимость от температуры констант скоростей затухания флуоресценции для В- и R-форм триптофанов аппроксимировали формулами (4), где члены с гауссовой функцией описывают резонансный

переход от одной формы ротамера к другой:

$$k_B = k_{B0} + k_{BT} \times \exp(-(T - T_{B0})^2 / \Delta T_{B0}^2);$$

$$k_R = k_{R0} - k_{RT} \times \exp(-(T - T_{R0})^2 / \Delta T_{R0}^2) + k_{RT1} \times \exp(-(T - T_{R1})^2 / \Delta T_{R1}^2); \quad (4)$$

$$\tau_B = 1/k_B; \quad \tau_R = 1/k_R,$$

В формулах (4) температура выражается в шкале Цельсия, k_B и k_R обозначают константы скоростей затухания флуоресценции В- и R-форм триптофана, k_{B0} и k_{R0} — константы скоростей затухания флуоресценции В- и R-форм в отсутствие перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$, параметр k_{BT} равен амплитуде скорости перехода триптофанов из В*- в R*-форму, k_{RT} определяет максимальное увеличение времени затухания флуоресценции для R-формы. Параметры T_{B0} и ΔT_{B0} обозначают центр и ширину области температур, благоприятной для перехода В-формы в R-форму, параметры k_{R0} , T_{R0} и ΔT_{R0} описывают изменение константы скорости затухания флуоресценции R-формы в результате перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$. Для более точной аппроксимации температурной зависимости k_R необходимо было предположить, что при высокой температуре ($T > -10^\circ\text{C}$) возникает канал перехода R*-формы в третью ротамерную форму. Параметры k_{RT1} , T_{R1} и ΔT_{R1} описывают резонансный переход R*-формы триптофана в

третью ротамерную форму, в результате чего происходит уменьшение времени затухания R-формы. Параметры τ_B и τ_R обозначают время затухания флуоресценции форм B и R соответственно. В данной модели учитываются как прямой ($B^* \rightarrow R^*$), так и обратный ($R^* \rightarrow B^*$) переходы.

Отвечающие длительностям флуоресценции τ_1 , τ_2 и τ_3 типы ротамеров триптофана (1), (2), (3) определяются смещением индольного кольца вокруг связи $C_\alpha-C_\beta$ на различные углы (0° (1), 60° (2) и 120° (3)). Переход от ротамера (1)* к ротамеру (2)* (звездочка обозначает возбужденные состояния ротамеров) сопряжен с преодолением потенциального барьера $\sim 4,4$ Ккал/М ($E_a \approx 1550$ см $^{-1}$) [19]. Предлагаемая схема динамики потенциальных поверхностей для акцептирующих мод ротамеров триптофана в возбужденном состоянии показана на рис. 4. Принцип функционирования этой схемы состоит в следующем. При таком расположении потенциальных поверхностей вследствие большой величины E_a надбарьерный переход из B^* - в R^* -форму затруднен. Однако если предположить, что при повышении температуры взаимное положение индольных колец триптофана изменяется, потенциальная поверхность B^* -формы может сближаться с потенциальной поверхностью R^* -формы, при этом условия для перехода $B^* \rightarrow R^*$ существенно облегчаются.

Для описания безызлучательных переходов в ароматических молекулах типа бензола справедливо приближение локальных мод, когда в качестве акцепторных мод рассматриваются различные колебания валентных связей [20]. Для ароматических циклических соединений акцепторные моды перехода связаны с колебаниями C—H-групп, при этом расстояния между колебательными уровнями достаточно велики (рис. 4). Мы считаем, что для перехода $B^* \rightarrow R^*$ активными являются деформационные колебания вне плоскости индольного макроцикла, частота которых составляет ~ 1300 см $^{-1}$ [21]. При низких и комнатных температурах акцептирующая мода перехода $B^* \rightarrow R^*$ с подавляющей вероятностью находится в основном состоянии (рис. 4), при этом расстояние между нулевым и первым колебательными уровнями составляет для деформационных колебаний ~ 1300 см $^{-1}$. При достаточно высокой энергии реорганизации среды активационный барьер перехода является большим (рис. 4, E_a). В результате, как мы уже отмечали выше, при обычных условиях переход B^* -ротамера в R^* -ротамер происходит по туннельному механизму с низкой скоростью. При изменении температуры в области стеклования среды в ближайшем окружении молекулы триптофана могут происходить значительные флуктуации структуры, в т.ч. микроконформационные пере-

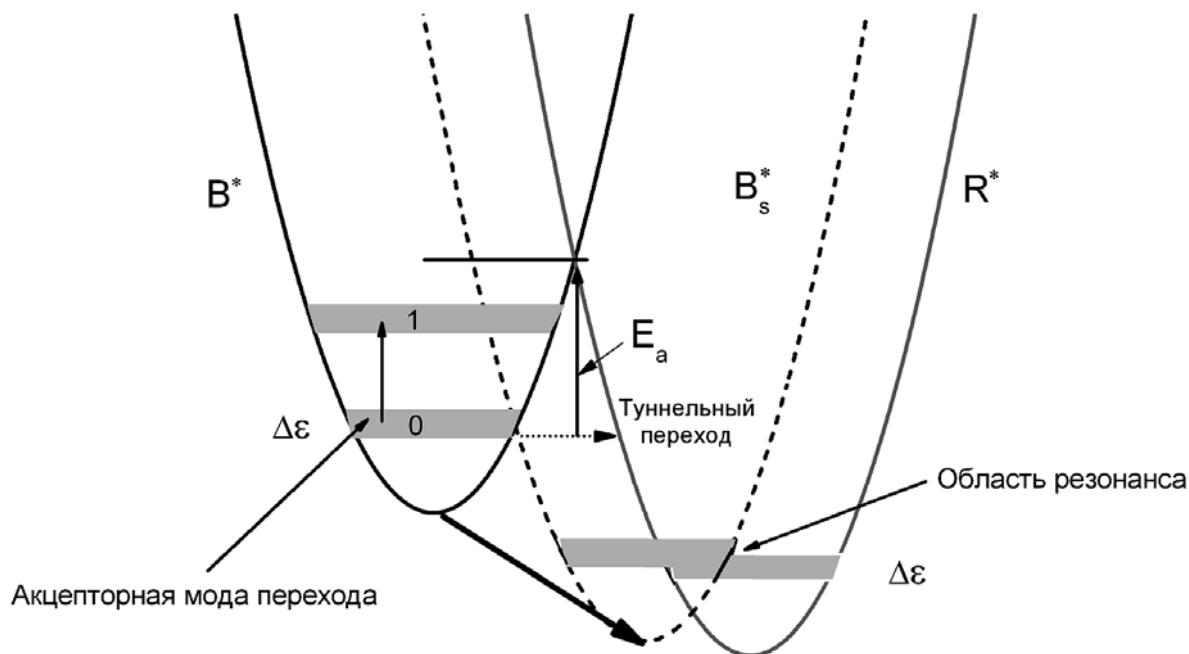


Рис. 4. Схема динамики потенциальных поверхностей возбужденных состояний ротамерных форм триптофана B^* и R^* при повышении температуры. Жирной стрелкой показано движение потенциальной поверхности B^* к потенциальной поверхности R^* при изменении температуры, E_a — энергия активации перехода $B^* \rightarrow R^*$, B_s^* — промежуточное положение потенциальной поверхности, 0 и 1 — нулевой и первый колебательный уровни энергии B-ротамера, $\Delta\epsilon$ — ширина спектра акцепторной моды

ходы, связанные с перестройкой водородных связей и зарядовых групп. Такой процесс может вызывать поворот индольного цикла ротамера В* на некоторый угол в направлении к его положению в R*-ротамере, что приводит к смещению потенциальной поверхности В*-состояния в сторону потенциальной энергии R*-состояния и, как следствие, к уменьшению энергии реорганизации и снижению активационного барьера перехода В*→R* (рис. 4). Более того, при определенной температуре может произойти совпадение колебательных спектров акцепторной моды для разных потенциальных поверхностей, в результате чего деформационная колебательная мода становится активной для перехода В*→R*. На рис. 4 этот момент изображен промежуточным положением потенциальной поверхности В_s*.

Таким образом, при изменении температуры может происходить совмещение (резонанс) спектров локальных колебаний молекулы ротамера триптофана в возбужденном состоянии для В*- и R*-форм. При определенной температуре имеет место резонанс, т.е. максимальное перекрытие колебательных спектров акцептирующей моды разных форм ротамеров в области пересечения термов возбужденных состояний двух форм триптофана, что соответствует максимальной скорости перехода В*→R* (рис. 4). При дальнейшем увеличении температуры происходит нарушение этого резонанса. При этом время затухания τ_B начинает возвращаться к первоначальному значению 4,8 нс. Однако время затухания τ_R не возвращается к величине 6,5 нс, а продолжает уменьшаться и при $T > 0^\circ\text{C}$ падает ниже 6 нс, т.к. для R-формы, вероятно, открывается свой канал дополнительного тушения флуоресценции, например, канал перехода данного ротамера в третью форму.

Отметим, что правильное описание антибатного характера температурной зависимости времени затухания флуоресценции триптофана возможно только в предположении, что переход В→R происходит в возбужденном состоянии молекулы триптофана. Действительно, внутримолекулярная константа скорости затухания флуоресценции не зависит от температуры. Температурная зависимость времени жизни возбужденного состояния молекул возникает за счет их интеркомбинационного перехода в триплетное состояние или безызлучательного перехода в основное состояние [22, 23]. При этом характер температурной зависимости времени затухания флуоресценции имеет аррениусовский характер. В нашем случае в дополнение к перечисленным выше механизмам антибатный характер температурной зависимости длительности флуоресценции В- и R-форм возникает в результате пе-

рехода В-формы триптофана в R-форму в синглетном возбужденном состоянии, переход В*→R*. Мы считаем, что уменьшение значения τ_B при увеличении температуры от -60 до -10°C происходит за счет открытия дополнительного канала дезактивации В*-формы — ее перехода в R*-форму. При дальнейшем повышении температуры резонанс между спектрами локальных колебаний ротамеров нарушается, в результате чего τ_B начинает возвращаться к первоначальному уровню.

Результаты аппроксимации показывают, что в водно-глицериновом растворе и в трегалозе положение центра гауссовой составляющей температурной зависимости времени затухания флуоресценции, ее ширина в области температур перехода В*→R*, а также амплитуда различаются. Центр гауссовой кривой температурной области находится около -13°C для триптофана в водно-глицериновом растворе и -23°C в трегалозе. Полуширина гауссовой составляющей температурной кривой составляет 40° (28 см^{-1}) для триптофана в водно-глицериновом растворе и 30° (21 см^{-1}) для триптофана в трегалозе. Максимальная скорость перехода В*→R* для водно-глицеринового раствора равна $2,2 \times 10^8\text{ с}^{-1}$. Для трегалозы данная скорость несколько меньше — $1,8 \times 10^8\text{ с}^{-1}$.

Интересным является факт более узкого распределения энергий локальных колебаний, благоприятных для перехода В*→R* триптофанов в трегалозе по сравнению с триптофаном в водно-глицериновом растворе. Это, по всей видимости, связано со структурой трегалозы, близкой к кристаллической, что вызывает эффект обеднения спектра локальных колебаний в окрестности молекулы триптофана, в некотором смысле аналогичный эффекту Шпольского в кристаллических матрицах при низких температурах.

Мы установили, что в водно-глицериновом растворе и трегалозе триптофаны существуют по крайней мере в виде трех ротамерных форм, отличающихся как по спектру свечения, так и по длительности флуоресценции. Впервые обнаружена удивительная немонотонная зависимость длительности флуоресценции τ_B и τ_R двух ротамеров от температуры, причем в диапазоне -60 до $+10^\circ\text{C}$ τ_B изменяется антибатно по отношению к τ_R . Примерно такая же зависимость получена нами и для триптофановой флуоресценции в фотосинтетических реакционных центрах пурпурных бактерий (неопубликованные данные). Для объяснения антибатного характера температурной зависимости τ_B и τ_R триптофанов в растворе мы предложили модель,

согласно которой в определенном температурном диапазоне возникают условия для перехода возбужденных молекул одной ротамерной формы В* в другую R*. Это становится возможным, если точки пересечения электронных поверхностей энергии возбужденных состояний двух форм ротамеров попадают в область перекрывания спектров локальных колебаний, и возникает резонанс. За пределами этого температурного диапазона резонанс между колебательными уровнями нарушается, вследствие чего длитель-

ность флуоресценции не зависит от температуры. Возможно, существует и иное объяснение обнаруженных нами эффектов. Мы продолжаем исследования в этой области и надеемся более точно определить природу антибатной зависимости τ_B и τ_R от температуры.

Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект 15-29-01167).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frauenfelder, H., and McMahon, B. (1998) Dynamics and function of proteins: the search for general concepts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4795–4797.
2. Fitter, J., Lechner, R.E., Buldt, G., and Dencher, N.A. (1996) Internal molecular motions of bacteriorhodopsin: hydration-induced flexibility studied by quasielastic incoherent neutron scattering using oriented purple membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7600–7605.
3. Frauenfelder, H., Sligar, S.G., and Wolynes, P.G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins, *Science*, **254**, 1598–1603.
4. Jackson, T.A., Lim, M., and Anfinsen, P.A. (1994) Complex nonexponential relaxation in myoglobin after photodissociation of MbCO: measurement and analysis from 2 ps to 56 ms, *Chem. Phys.*, **180**, 131–140.
5. Johnson, J.B., Lamb, D.C., Frauenfelder, H., Muller, J.D., McMahon, B., Nienhaus, G.U., and Young, R.D. (1996) Ligand binding to heme proteins, *Biophys. J.*, **71**, 1563–1573.
6. Paciarony, A., Cinelli, S., and Onori, G. (2002) Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study, *Biophys. J.*, **83**, 1157–1164.
7. Palazzo, G., Mallardi, A., Hochkoeppler, A., Cordone, L., and Venturoli, G. (2002) Electron transfer kinetics in photosynthetic reaction centers embedded in trehalose glasses: trapping of conformational substates at room temperature, *Biophys. J.*, **82**, 558–568.
8. Kriegl, J.M., Forster, F.K., and Nienhaus, G.U. (2003) Charge recombination and protein dynamics in bacterial photosynthetic reaction centers entrapped in a sol-gel matrix, *Biophys. J.*, **85**, 1851–1870.
9. Mei, G., Di Venere, A., Agrò, A.F., De Matteis, F., and Rosato, N. (2003) Dipolar relaxation times of tryptophan and tyrosine in glycerol and in proteins: a direct evaluation from their fluorescence decays, *J. Fluorescence*, **13**, 467–477.
10. Malferrari, M., Savitsky, A., Mamedov, M.D., Milanovsky, G.E., Lubitz, W., Mobius, K., Semenov, A.Yu., and Venturoli, G. (2016) Trehalose matrix effects on charge-recombination kinetics in photosystem I of oxygenic photosynthesis at different dehydration levels, *Biochim. et Biophys. Acta (Bioenergetics)*, **1857**, 1440–1454.
11. Schlamadinger, D.E., Gable, J.E., and Kim, J.E. (2009) Hydrogen bonding and solvent polarity markers in the UV resonance Raman spectrum of tryptophan: application to membrane proteins, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14769–14778.
12. Dashnau, J.L., Zelent, B., and Vanderkooi, J.M. (2005) Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and ab initio calculations, *Biophys. Chem.*, **114**, 71–83.
13. Chen, Y., and Barkley, M.D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins, *Biochemistry*, **3**, 9976–9982.
14. Бурштейн Э.А. (1983) Собственная люминесценция белка как метод изучения быстрой структурной динамики, *Мол. биология*, **17**, 455–467.
15. Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Красильников П.М., Пашенко В.З., Сейфуллина Н.Х., Гришанова Н.П., Рубин А.Б. (2016) Температурная зависимость флуоресценции триптофана в реакционных центрах *Rb. sphaeroides* при их замораживании до 80 К в темноте или на свету как показатель конформационной динамики белка, *ДАН*, **467**, 350–354.
16. Нокс П.П., Лукашев Е.П., Корватовский Б.Н., Горохов В.В., Пашенко В.З., Сейфуллина Н.Х., Гришанова Н.П., Рубин А.Б. (2016) Сравнение температурной зависимости процесса рекомбинации в ион-радикальной паре P870⁺Q⁻ и триптофановой флуоресценции в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodospirillum rubrum*, *Биофизика*, **61**, 1118–1127.
17. Ross, J.A., and Jameson, D.M. (2008) Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1301–1312.
18. Olsson, C., Jansson, H., and Swenson, J. (2016) The role of trehalose for the stabilization of proteins, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 4723–4731.
19. Adams, P.D., Chen, Y., Ma, K., Zagorski, M.G., Sonnichsen, F.D., McLaughlin, M.L., and Barkley, M.D. (2002) Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides, *JACS*, **124**, 9278–9286.
20. Hayward, B.J., and Henry, B.V. (1976) Experimental manifestations of the localmode description of high energy polyatomic overtone spectra, *Chem. Phys.*, **12**, 387–396.
21. Тарасевич Б.Н. (2012) ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы, Хим. факультет МГУ, Москва, с. 54.
22. Медведев Э.С., Ошеров В.И. (1983) Теория безызлучательных переходов в многоатомных молекулах, Наука, Москва, 280 с.
23. Эмануэль Н.М., Кузьмин М.Г. (1985) Экспериментальные методы химической кинетики, МГУ, Москва, с. 382.

TEMPERATURE DEPENDENCE OF TRYPTOPHAN FLUORESCENCE LIFETIME IN GLYCEROL AND TREHALOSE AQUEOUS SOLUTIONS

V. V. Gorokhov, P. P. Knox, B. N. Korvatovskiy,
N. Kh. Seifullina, S. N. Goryachev, and V. Z. Paschenko*

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: vz.paschenko@gmail.com*

Received June 15, 2017

Revision received August 15, 2017

The temperature dependences of fluorescence kinetics of tryptophan molecules in glycerol solution and in a trehalose matrix were studied. The fluorescence decay kinetics were measured in the spectral range 292.5–417.5 nm with nanosecond time resolution. The kinetics curves were analyzed in three-exponential approximation, and the spectral distribution (DAS) of these components was determined. An antibate course of fluorescence decay times of two (fast and medium) components in the temperature range from –60 to +10 °C was observed. The third (slow) component showed a weak temperature dependence. The antibate behavior of fluorescence lifetimes of the fast and medium components is explained on the assumption that some of the excited tryptophan molecules are transferred from a short-wave form B with short fluorescence lifetime to a long-wave R form with an intermediate fluorescence lifetime. This transfer occurs in a certain temperature range.

Keywords: tryptophans, rotamers, fluorescence, temperature dependence, fluorescence decay kinetics